果蝇微小 RNA 及其在衰老过程中的作用

杨德英, 廉　婷, 樊晓兰, 李地艳, 杨明耀*

(四川农业大学动物科技学院, 畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室, 成都 611130)

摘要: 微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类长度在 22 nt 左右的内源非编码小 RNA,广泛存在于动物、植物、病毒等多种有机体中,是机体正常衰老与疾病的重要调控因子。本文对果蝇不同生长时期 miRNA 的表达模式、主要衰老相关信号通路以及与衰老相关的 miRNA 进行了综述。在果蝇的不同发育时期均有特定的 miRNA 发挥重要作用,其表达模式与功能相关;miRNA 参与了主要衰老分子信号通路的调控,如胰岛素/胰岛素样生长因子(IIS)通路和雷帕霉素靶蛋白(TOR)通路。研究表明,miRNA 通过调控衰老相关信号通路中的靶基因,进而促进或延缓果蝇衰老,如 miR-34, miR-8, miR-14, miR let7 和 miR-277 等。因此,研究参与衰老调控的 miRNA,为阐明衰老机制及抗衰老药物的设计奠定了基础。

关键词: 果蝇; 衰老; 微小 RNA; 信号通路; 表达模式; 靶基因

中图分类号: Q963　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2015)01-0082-08

MicroRNAs in *Drosophila* and their roles in aging

YANG De-Ying, LIAN Ting, FAN Xiao-Lan, LI Di-Yan, YANG Ming-Yao* (Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNAs with a length around 22 nt, are widely distributed in various organisms such as animals, plants and viruses. miRNA is an important regulatory factor for aging and disease. Here, we reviewed the expression patterns of miRNA during different developmental stages of *Drosophila melanogaster*, the expression profiles of miRNA in major signaling pathways responsible for aging, and finally the roles of miRNA in aging. The specific miRNA plays an important role in different developmental stages of *D. melanogaster* and the expression pattern of miRNA is related to its functions. The genetic pathways of insulin/IGF signaling (IIS) and target of rapamycin (TOR) are reported as important signaling pathways for aging. Some studies have showed that miR-34, miR-8, miR-14, miR let7, and miR-277 could either shorten or extend lifespan through regulating the target genes in aging-related pathways. Studies on miRNA involved in aging provide the basis for the research on molecular mechanisms of aging and help to design the strategies for prevention of age-related diseases.

Key words: *Drosophila*; aging; microRNA (miRNA); signaling pathway; expression pattern; target gene

全球正面临一个老龄化社会,到 2050 年,全球 80 岁以上的人口将翻 3 倍,而超过 70% 的 65 岁以上老人均有 2 种或 2 种以上的慢性病(如关节炎、糖尿病和中风等),人口老龄化将给个人和社会带来沉重的负担(Fontana *et al.*, 2014)。衰老是一个复杂和渐进的生物学过程,涉及多个器官和组织的慢性改变,与多种老年性疾病相关,且认为衰老是导致衰老相关疾病最主要的风险因子,如神经元变性和癌症等(Niccoli and Partridge, 2012)。微小 RNA (microRNA, miRNA)在基因转录后调控中起着非常重要的作用,参与了胚胎发育、细胞分化、增殖、神经发生、代谢及细胞凋亡等几乎所有生物过程的调控(Legeai *et al.*, 2010),是机体正常衰老与疾病的重要调控因子。已有研究表明,miRNA 在成年人神

基金项目: 四川省教育厅创新团队项目; 四川省千人计划项目; 国家自然科学基金项目(31471998)

作者简介: 杨德英, 女, 1982 年生, 四川冕宁人, 博士,助理研究员, 研究方向为衰老与抗衰老, E-mail: dnaydy@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yangmingyao@sicau.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-09-18; 接受日期 Accepted: 2015-01-02

经系统中非常重要，尤其是在维持神经元及调控神经性疾病相关基因和信号通路等方面（Bilen *et al*. 2006；Eacker *et al*. 2009）。近年来，研究者以果蝇 *Drosophila*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和小鼠 *Mus musculus* 等为模型探讨了 miRNA 与衰老的关系，发现了一系列与衰老相关的 miRNA，如 miR-14，miR-34 和 miR-27a 等（de Lencastre *et al*., 2010；Liu *et al*., 2012；Garg and Cohen, 2014）。

尽管整个衰老过程是复杂的，但在多种模式生物中（从酵母到哺乳动物）调控寿命的机理在进化上具有高度保守性（López-Otin *et al*., 2013），因此可以借助遗传学常用模式生物——果蝇，来探讨人类的老化过程。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 具有生活史短、易饲养、遗传背景易于控制等优势，并已经探明了从胚胎、幼虫到变态的整个生命过程，是研究遗传与发育生物学的经典模式生物。目前，果蝇已被用于多细胞机体衰老和人类神经退行性疾病的研究（He and Jasper, 2014）。为阐明衰老机制及抗衰老药物的设计奠定基础，本文对与果蝇衰老相关的 miRNA 及其作用进行了综述。

1　果蝇不同生长时期的 miRNA 表达模式

已有研究表明，在果蝇的不同发育时期均有特定的 miRNA 发挥重要作用（Aravin *et al*., 2003；Aboobaker *et al*., 2005；Ruby *et al*., 2007；Graveley *et al*., 2011）。目前，通过正向遗传学、深度测序和计算机预测等方法，已鉴定出了果蝇的 256 个 miRNA（Berezikov *et al*., 2006；Kozomara and Griffiths-Jones, 2011；Berezikov *et al*., 2011；Esslinger *et al*., 2013）。

果蝇不同发育时期 miRNA 的表达类型和表达丰度均有所差异。果蝇的生长发育主要经历了胚胎期、幼虫期、蛹期和成蝇期。有学者发现 miR-3 ~ miR-7 在果蝇早期胚胎期出现，miR-12 和 miR-1 随生长表达量增加，在成蝇体内表达量最高，而 miR-9 和 miR-11 正相反（Lagos-Quintana *et al*., 2001）。此外，Aravin 等（2003）初步揭示了 miRNA 在果蝇不同发育时期的表达丰度，382 个 miRNA 克隆经分析后获得 62 条非冗余基因序列，其中胚胎期（0 – 24 h）的克隆数最多（189 个），其次是成蝇期（121 个）和幼虫期（28 个）；值得注意的是，在胚胎期的 6 – 24 h 和幼虫期 miRNA 克隆数较少（3 ~ 12 个），在蛹期未检测到 miRNA，其原因可能是克隆方法未能检测到低水平表达和特定细胞类型（或环境）表达的 miRNA。因此，Ruby 等（2007）采用计算机预测和焦磷酸高通量测序两种互补的方法分析了果蝇的 miRNA，其中采用焦磷酸高通量测序测定了果蝇 10 个不同组织或时期的 miRNA，包括超早期胚胎（0 – 1 h）、早期胚胎（2 – 6 h）、中期胚胎（6 – 10 h）和晚期胚胎（12 – 24 h）、幼虫（1 和 3 龄）、成虫盘（imaginal discs）、蛹期（0 – 4 d）、成蝇头部、成蝇躯干和组织培养细胞；共鉴定出 59 个新 miRNA，发现大量的 miRNA 在特定的发育阶段表达，特别是成虫盘；并发现有 33 个 miRNA 表达范围较窄，只在成虫盘（61%）、成蝇头部（24%）、成蝇躯干（12%）和胚胎晚期（3%）表达。

果蝇不同发育时期 miRNA 在功能和进化上有高度保守性。Aravin 等（2003）发现 62 条 miRNA 序列包含了 43 个基因家族，其中有 14 个基因家族普遍保守，包含了仅在哺乳动物中保守的 3 个基因家族和在线虫中保守的 6 个基因家族。很多 miRNA 的功能在脊椎动物和无脊椎动物中都高度保守，例如果蝇体内与肌肉相关的特异 miRNA（包括位于果蝇中胚层和肌肉的 miR-1、神经系统的 miR-124 和 miR-7 等）（Aboobaker *et al*., 2005）；动物中保守的 miR-263，miR-8/200 和 miR-34 家族分别涉及人类老龄化、肿瘤及神经性退化等重大疾病（Hilgers *et al*., 2010；Vallejo *et al*., 2011；Liu *et al*., 2012）；人、小鼠和果蝇的 miR-9 成熟肽序列完全相同，可见其进化上的保守性，并且它们均对神经系统发育有重要调控作用（Li *et al*., 2006）。

不同发育时期的 miRNA 表达模式与其生物学功能相关。Aboobaker 等（2005）检测了 24 个 miRNA 位点，发现果蝇胚胎时期 miRNA 的不同空间表达模式与其功能相关，揭示了 miRNA 的生物学功能及受其调控的发育模式之间的联系。同时，Liu 等（2012）测定了 3，30 和 60 日龄成年果蝇大脑的 miRNA，发现有 29 个 miRNA 在大脑表达，其中大部分随着年龄增加稳定表达或表达量降低（如 miR-12，miR-133，miR-263a，miR-263b，miR-276 和 miR-279）。另外，果蝇 miRNA 的表达具有组织特异性，推测可能与其功能有关，如 miR-124 和 miR-13b-1/13b-2/2c 在中枢神经系统表达，而 miR-315 在大脑和腹神经索的一个子域转录；miR-92a 和 miR-7 在大脑和腹神经索的亚细胞群中转录，miR-279，miR-12/283/304 簇和 miR-263b 均在胚胎周围神经系统表达（Aboobaker *et al*., 2005）。此外，miR-12/

283/304 簇还在果蝇胚胎发育过程中表达，协同调控 Hedgehog 信号途径以及与 miR-310s 家族协同调控胚胎体轴的形成，从而保证果蝇胚胎发育正常有序的进行(Moretti *et al*., 2010)。

2 与果蝇寿命调控相关的重要信号通路

调控果蝇寿命的重要信号通路包括胰岛素/胰岛素样生长因子信号(insulin/insulin-like growth factor signaling, IIS)通路和雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)通路，已经证实 IIS 和 TOR 信号通路中有大量的靶基因参与了机体衰老过程的调控，而靶基因与数量众多的 miRNA 相互作用，形成了一个错综复杂的基因表达调控网络(图 1)(Garg and Cohen, 2014)。信号通路活性受交叉调控网络的调节，以确保细胞(TOR)和机体(IIS)水平的生长信号一致，可帮助成年有机体适应多变环境中的新陈代谢(Grewal, 2009)。IIS 和 TOR 信号通路通过营养物质的有效吸收来调节机体发育，影响重要的生长阶段(Mirth *et al*., 2005; Johnson *et al*., 2013)。

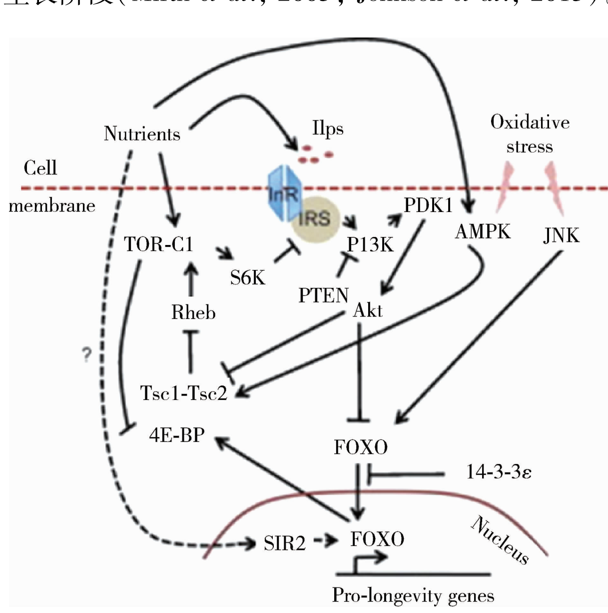


图 1 黑腹果蝇主要的衰老通路网络图
(引自 Garg and Cohen, 2014)

Fig. 1 Network of the major aging pathways in *Drosophila melanogaster* (adopted from Garg and Cohen, 2014)

ILPs: 胰岛素样肽 Insulin-like peptides; IRS: 胰岛素受体底物 Insulin receptor substrate. 实线示已阐明的通路，虚线示未知的通路。Solid line indicates the known direct links between pathways, while the dotted line indicates the unknown pathways.

2.1 胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路(IIS)

IIS 通路在果蝇和哺乳动物中相似，其调节寿命和衰老的机制在生物进化中具有保守性，并在决定寿命和抗压反应中发挥着重要作用(Partridge *et al*., 2011; Garg and Cohen, 2014)。降低果蝇 IIS 通路活性可改善衰老引起的损伤，降低死亡率(Tatar *et al*., 2001; Clancy *et al*., 2001)，如降低果蝇胰岛素受体——胰岛素样肽(insulin like peptides, dilps)(Grönke *et al*., 2010)及其受体底物——chico 和 Lnk 的表达可延长寿命(Clancy *et al*., 2001; Slack *et al*., 2010)，同时也可以增加负反馈通路调控因子 PTEN 的表达(Hwangbo *et al*., 2004)。另外，果蝇寿命的延长或缩短还取决于大脑中胰岛素神经分泌细胞(insulin producing neurosecretory cells, IPC)产生胰岛素的量(Broughton and Partridge, 2009)。切除果蝇的 IPCs 能改变碳水化合物和脂类代谢，提高果蝇抗氧化应激和饥饿的能力，从而延长寿命(Broughton *et al*., 2005)。果蝇叉头框转录因子 O (*Drosophila* forkhead box transcription factor O, dFOXO)是 FoxO 转录因子家族的代表，是降低 IIS 通路信号和延长寿命过程中所必须的转录因子之一(Alic *et al*., 2014)。另外，激活肠道、脂肪体和其他器官神经内分泌细胞中的 dFOXO 也可以延长寿命，并促进健康老龄化。有研究表明，过表达成年果蝇脂肪体内 dFOXO 和降低其负反馈调控因子 14-3-3ε 的表达可延长寿命(Hwangbo *et al*., 2004; Nielsen *et al*., 2008; Alic *et al*., 2014)。

目前，已经发现了参与 IIS 通路调控的部分 miRNA，如 miR-23, miR-71 和 miR lin-4 等(de Lencastre *et al*., 2010; Kato and Slack, 2013; Garg and Cohen, 2014)。在老年动物中，miR-239 的缺失显著降低了 IIS 信号通路中靶基因 *age*-1 和磷酸肌醇依赖性激酶-1 (pyruvate dehydrogenase kinase, pdk-1)基因的 mRNA 水平(Antebi, 2007)，提示在 IIS 活性增高时，miR-239 可能是这些基因的下游基因(de Lencastre *et al*., 2010)。另外，*pdk*-1 的 mRNA 上有 miR-71 的结合位点，其表达受 miR-71 的抑制，miR-71 的缺失增加了老年动物中靶基因 *pdk*-1 的 mRNA 表达水平并显著地缩短寿命，表明 miR-71 主要是通过降低 IIS 信号通路中 pdk-1 的活性来延长寿命(de Lencastre *et al*., 2010)。

2.2 雷帕霉素靶蛋白(TOR)信号通路

TOR 是一种在所有物种中均保守的丝氨酸(Ser)-苏氨酸(Thr)蛋白激酶，调控所有真核细胞的生长和新陈代谢水平(Katewa and Kapahi, 2011)。TOR 信号通路通过 3 种信号(养分利用率、能量水

平和生长因子）来调控细胞生长，与 IIS 信号通路相通（Chen *et al*., 2010）。细胞内能量水平（AMP 与 ATP 的比值）可以通过腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine monophosphate activated protein kinase, AMAPK）和氨基酸来调控 TOR 的活性（Garg and Cohen, 2014），代谢组织中 AMPK 的过表达可通过 TOR 信号通路延长寿命（Stenesen *et al*., 2013）。另外，在哺乳动物细胞中，结节性硬化蛋白基因 1（tuberous sclerosis complex gene 1, *TSC*1）和结节性硬化蛋白基因 2（tuberous sclerosis complex gene 2, *TSC*2）是 mTOR（mammalian target of rapamycin, mTOR）信号通路中重要的抑制因子。当 TOR 通路通过生长因子（胰岛素或 IGF）引发的信号激活 AKT/PKB（蛋白激酶 B），可以抑制 *TSC*1 和 *TSC*2 的功能，同时可激活多重蛋白功能复合物 TORC1 和 TORC2（Chen *et al*., 2010）。TORC1 可通过磷酸化 S6K 和 4E-BP1 促进 mRNA 的转录和蛋白质合成，限食降低了无脊椎动物和部分哺乳动物组织的 mTORC1；而在不限食条件下，采用药物或遗传学方法降低 mTORC1 的活性，延长了无脊椎动物和小鼠的寿命（Johnson *et al*., 2013）。TORC2 复合物调控细胞骨架肌动蛋白，可通过下调 AKT 的磷酸化作用来上调 IIS 信号通路的主要激酶（Wullschleger *et al*., 2006）。

雷帕霉素（rapamycin）是一种人类的免疫抑制剂和抗癌治疗药物，可抑制 TOR 信号通路中的 TOR 激酶（Guertin and Sabatini, 2009; Bjedov *et al*., 2010; Johnson *et al*., 2013）。雷帕霉素是公认的一种 TOR 特异性抑制剂，可通过细胞内蛋白 FKBP12 与 TOR 中的 FKBP12-repamycin-binding 区域结合，抑制 TORC1 的活性（Bjedov *et al*., 2010）。已有研究表明，雷帕霉素可以延长果蝇寿命，能有效地抑制 TOR 激酶的活性（Bjedov *et al*., 2010; Esslinger *et al*., 2013）。Bjedov 等（2010）发现使用浓度为 50, 200 和 400 μmol/L 的雷帕霉素都能显著延长果蝇寿命，其中使用 200 μmol/L 浓度的雷帕霉素延长的平均寿命幅度最大。同时，也有学者发现浓度为 20 μmol/L 的雷帕霉素延迟了果蝇幼虫的发育和羽化，果蝇的平均寿命延长了 19 d（Esslinger *et al*., 2013）。在果蝇体内表达 miR-277 可缩短寿命，使用雷帕霉素处理 miR-277 表达和未表达的雄性果蝇，miR-277 表达组的果蝇寿命没有得到延长，其原因可能是雷帕霉素增强了 miR-277 表达，从而缩短寿命（Esslinger *et al*., 2013）。此外，果蝇性别也会影响雷帕霉素的作用效果（Johnson *et al*., 2013, Esslinger *et al*., 2013）。经雷帕霉素处理，雌性果蝇寿命延长的时间长于雄性，其原因可能是雌性果蝇通过产卵，部分地中和了雷帕霉素的毒性（Esslinger *et al*., 2013）。

3　影响果蝇衰老的 miRNA

目前，已经报道了为数不多的与果蝇衰老相关的 miRNA，主要包括 miR-34, miR-8, miR-14, miR let7 和 miR-277，并已经阐明了这 5 种 miRNA 及其靶基因的调控机制。

3.1　miR-34

miR-34 可调控果蝇的唾液腺和肌肉器官发育、神经形成、细胞凋亡及神经组织退化，其靶基因 *Eip74EF* 参与了甾体激素通路的调控（Burgler and Macdonald, 2005; Robins *et al*., 2005; Yamakuchi and Lowenstein, 2009; Liu *et al*., 2012）。miR-34 高度保守，在果蝇、秀丽隐杆线虫、小鼠和人类的直系同源种子序列完全相同，miR-34 在果蝇的发育期几乎检测不到，但在整个成熟时期表达量上调（Liu *et al*., 2012）。Liu 等（2012）发现 miRNA 在调控通路中通过沉默发育基因来影响成年人的年龄相关性疾病，果蝇 miR-34 在这个过程中是一个发挥关键作用的 miRNA 分子；miR-34 在成年果蝇体内沉默 *EF74A* 基因，在一定程度上降低了整个成年期 E74A 蛋白的表达，以保持大脑的完整性和活性；miR-34 表达量上调可延长平均寿命并减轻由人类致病性多聚谷氨酰胺疾病蛋白所导致的神经变性，而缺失则会激活加速脑部衰老和迟发型脑退化的基因表达谱。miR-34a 还可以作为 p53 通路的效应因子，其在衰老细胞中表达升高，可抑制 E2F、c-Myc、沉默调节蛋白 1 抗体（silent information regulator 1, SIRT1）、周期蛋白依赖性激酶 4（cyclin dependent kinase 4, Cdk4）和 Cdk6 等参与的细胞周期捕获、肿瘤抑制和衰老等生物学过程（Christoffersen *et al*., 2010）。

3.2　miR-8

miR-8 在果蝇体内较为保守，有超过 250 个保守的靶基因（Grün *et al*., 2005），在不同空间和时间表达模式下调控不同的靶基因。果蝇 *atrophin* 是 miR-8 的靶基因，属于哺乳动物转录调节因子 *atrophin* 家族，与神经性退化疾病萎缩症相关，其直系同源基因与 miR-8 之间的调控关系在哺乳动物中

具有保守性；*atrophin* 的 3′UTR 有 4 个 miR-8 靶位点，其中有 2 个位点在拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura* 中保守（Kato and Slack, 2013）。miR-8 突变体果蝇中 *atrophin* mRNA 在转录后表达量增加，表明 *atrophin* mRNA 的 miR-8 靶位点不稳定，miR-8 可以直接通过这些靶位点调控体内的 *atrophin* 表达；miR-8 在果蝇的多个组织中表达，并在胚胎和幼虫体内有复杂的表达模式，而 miR-8 突变体果蝇的整个幼虫时期缺失 miR-8，导致蛹和早期成蝇时期的存活率降低；另外，miR-8 与 *atrophin* 在中枢神经系统中的表达有重叠，上调神经细胞中的 *atrophin* 表达量，可加速细胞凋亡，提示 miR-8 突变体果蝇过表达 *atrophin* 会导致中枢神经系统紊乱和相应的行为反应，可能会缩短寿命（Kato and Slack, 2013）。

U-shaped 是 miR-8 的另一个靶基因，可通过抑制磷脂酰肌醇-3-羟激酶（phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K）活性来调控果蝇幼虫脂肪体内的 IIS 信号通路（Hyun *et al*., 2009）。miR-8 突变体的表达降低了 IIS 信号通路的活性，影响了果蝇幼虫时期的发育；同时，还发现成年果蝇的头部脂肪中也有 miR-8 表达，推测其参与了 IIS 信号通路的调控（Garg and Cohen, 2014）。此外，还发现整个果蝇成蝇期 miR-8 的表达量没有显著变化，但是还不确定 miR-8 在特定条件下是否会影响果蝇的寿命，还需要深入分析。

3.3 miR-14

miR-14 可调控细胞凋亡及物质代谢，其靶基因蜕皮激素受体（ecdysone receptor, EcR）参与了蜕皮激素信号通路的调控（Xu *et al*., 2003; Varghese and Cohen, 2007）。蜕皮激素是昆虫前胸腺分泌的一种甾体激素，蜕皮激素及其受体 EcR 在果蝇发育过程中起关键作用。miR-14 在果蝇大脑衰老过程中呈下调趋势，在体内可抑制 EcR 活性（Liu *et al*., 2012）。在果蝇幼虫向蛹转变时期，成熟 miR-14 表达水平瞬时降低，说明蜕皮激素可以诱导 EcR 的表达呈现瞬时升高（Sempere *et al*., 2003）。同时，EcR 可以诱导蜕皮激素下调 miR-14，使用蜕皮激素处理脂肪组织和 S2 细胞后降低了 miR-14 初级转录本水平，但是不能通过在样本中表达 UAS-RNAi 转基因或使用 dsRNA 处理来敲除成熟的 *EcR* 转录本（Varghese and Cohen, 2007）。蜕皮激素信号通路与 miR-14 和 *EcR* 基因转录相互调控，蜕皮激素有两种方式降低 EcR 的活性：第一，促进 EcR 转录自调控；第二，降低 miR-14 诱导的 EcR 活性。保持 EcR 自身诱导及 EcR 和 miR-14 相互抑制作用之间的平衡，机体将保持低水平的 EcR 活性；反之，当蜕皮激素作用后，平衡将被破坏从而导致较高水平的 EcR 活性（Varghese and Cohen, 2007）。miR-14 突变体果蝇出现了寿命缩短和抗压能力降低等表型（Xu *et al*., 2003），而寿命表型与不同的靶基因上调相关，如 *EcR*（Varghese and Cohen, 2007）。miR-14 的缺失防止了 EcR 自身诱导反射弧的丢失，导致 EcR 活性增加；EcR 的调控紊乱只是 miR-14 突变体果蝇的部分表现，表明其他潜在的 miR-14 靶基因可能在不同环境下发挥着重要作用（Varghese and Cohen, 2007）。

miR-14 还能调控 IPC 神经内分泌细胞中的胰岛素样多肽的产生（Varghese and Cohen, 2007），而低水平的胰岛素样多肽可能有希望延长寿命（Garg and Cohen, 2014）。蜕皮激素信号通路与 IIS 通路相似，降低蜕皮激素通路活性可以延长寿命，miR-14 可同时调控这两个与衰老相关的通路；值得注意的是，miR-14 和 miR-34 对蜕皮激素信号通路的调控可能是通过 miR-8 影响 IIS 通路的活性实现的，提示它们是反馈系统的一部分，平衡了代谢通路间的活性，潜在地影响着衰老（Garg and Cohen, 2014）。

3.4 miRNA let7

miRNA 除了调控机体衰老，还参与了组织和细胞衰老的调控。miRNA let7 在果蝇体内参与了神经发育、转录调控及神经肌肉重塑的调控（Burgler and Macdonald, 2005; Sokol, 2008）。在果蝇的睾丸中，一组被称为“apical hub”的细胞分泌自我更新因子 Unpaired（Upd），其基因 *upd* 是 miRNA let7 的靶基因，可以促进干细胞内环境的维持。老年果蝇干细胞内环境稳态随着年龄的增长而下降，*upd* mRNA 的表达量也随之显著降低。IGF-II 信使 RNA 结合蛋白（Imp）是保守的 RNA 结合蛋白家族成员，调控 RNA 的稳定性、转录和定位（Yisraeli, 2005），可通过反作用于小干扰 RNA 稳定睾丸中心细胞的 *upd* mRNA，Imp 表达会降低老年雄性果蝇的生殖干细胞（Toledano *et al*., 2012）。miRNA let7 的表达量随着机体的衰老而增加，30 日龄雄性果蝇睾丸内 let-7 的表达量是 1 日龄的 2 倍，可破坏 Imp 的稳定；同时，表达的 Imp 易被 miRNA let7 降解，并不能引起 30 和 50 日龄果蝇睾丸中 Imp 的表达量增加，表明 miRNA let7 的调控有助于降低老年果蝇体内的 Imp 蛋白；Imp 可以稳定 *upd* mRNA，老年雄性体内 Imp 的缺失导致了 *upd* mRNA 的降解，从而降低了生殖

干细胞数，与果蝇睾丸组织的衰老密切相关（Toledano *et al.*, 2012）。

3.5　miR-277

miR-277 在雄性和雌性果蝇中均有表达，是成年果蝇体内最为丰富的 miRNA 之一，可以调控支链氨基酸（branched chain amino acid, BCAA）的分解代谢和 TOR 激酶活性；体外培养细胞和果蝇体内的代谢分析均表明，其代谢基础可能是支链 α-酮酸（branched chain of alpha keto acid, BCKA）的聚集，而不是 BCAAs，因此要避免在蛋白翻译时 BCAAs 增多所致的潜在危害（Esslinger *et al.*, 2013）。BCAA 浓度的增加可激活 TOR 激酶活性（Dann and Thomas, 2006；Katewa and Kapahi, 2011），并缩短寿命（Esslinger *et al.*, 2013）。Esslinger 等（2013）推测 miR-277 的表达可降低 BCAAs 的代谢清除能力，并证实 miR-277 在果蝇胸腔的高表达可能参与飞行肌肉中 BCAA 新陈代谢的调控；推测 miR-277 的生理功能可能是参与果蝇衰老代谢适应过程的调控，其表达量在成年 1 周后开始呈下调趋势，机体内的 miR-277 重组表达可缩短寿命，如果再同时降低胰岛素信号对机体来说是致死性的。

4　小结与展望

miRNA 具有保守性、时序性和组织特异性等特征，参与了果蝇发育时期生命活动的调控，并与靶基因形成了复杂的基因表达调控网络。已发现部分 miRNA（如 miR-8 和 miR-14 等）参与了果蝇衰老相关信号通路的调控，为阐明人类衰老机制和抗衰老药物的设计奠定了基础。

miRNA 在衰老过程中的调控机制是一个较新的研究领域。miRNA 及其靶基因是有机体重要的生物调控因子，可通过不同的分子通路影响衰老及衰老相关疾病的生物学过程。以经典模式生物果蝇来研究衰老过程中 miRNA 及其靶基因参与的相关信号通路，有助于阐明相关 miRNA 的作用机制和人类的衰老过程，也为抗衰老药物设计与针对性治疗衰老相关疾病提供了重要依据。

目前，已经发现了大量的果蝇 miRNA，但是已报道的能延缓衰老的 miRNA 甚少。有大量的 miRNA 在果蝇脑部表达，如 miR-13b-2, miR-317, miR-305, miR-210 和 miR-274 等（Berezikov *et al.*, 2011），还有其他一些与神经肌肉发育相关的 miRNA，包括 miR-9a, miR-133 和 miR-310-313 等（Li *et al.*, 2005；Boutz *et al.*, 2007；Cayirlioglu *et al.*, 2008），为筛选延缓衰老和防治衰老相关疾病的 miRNA 提供了基础资料。另外，大量研究已经证明雷帕霉素和限食能够延长果蝇、线虫和小鼠等的寿命，对其作用机理已有所研究，但是对于参与调控的 miRNA 及其作用机制还不清楚。因此，筛选雷帕霉素和限食延缓果蝇衰老过程中参与调控的 miRNA 及研究其调控机制，有助于深入探索果蝇的衰老机理，为人类抗衰老及衰老疾病的相关研究奠定基础。

参考文献（References）

Aboobaker AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM, Lai EC, 2005. *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(50): 18017 - 18022.

Alic N, Tullet JM, Niccoli T, Broughton S, Hoddinott MP, Slack C, Gems D, Partridge L, 2014. Cell-nonautonomous effects of dFOXO/DAF-16 in aging. *Cell Rep.*, 6(4): 608 - 616.

Antebi A, 2007. Genetics of aging in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.*, 3(9): 1565 - 1571.

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T, 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell*, 5(2): 337 - 350.

Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RHA, 2006. Approaches to microRNA discovery. *Nat. Genet.*, 38(Suppl.): S2 - S7.

Berezikov E, Robine N, Samsonova A, Westholm JO, Naqvi A, Hung JH, Okamura K, Dai Q, Bortolamiol-Becet D, Martin R, Zhao Y, Zamore PD, Hannon GJ, Marra MA, Weng Z, Perrimon N, Lai EC, 2011. Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res.*, 21(2): 203 - 215.

Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM, 2006. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol. Cell*, 24(1): 157 - 163.

Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L, 2010. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell. Metab.*, 11(1): 35 - 46.

Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, Black DL, 2007. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev.*, 21(1): 71 - 84.

Broughton S, Partridge L, 2009. Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem. J.*, 418(1): 1 - 12.

Broughton SJ, Piper MDW, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Driege Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leevers SJ, Partridge L, 2005. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(8): 3105 - 3110.

Burgler C, Macdonald PM, 2005. Prediction and verification of

microRNA targets by MovingTargets, a highly adaptable prediction method. *BMC Genomics*, 6(1): 88.

Cayirlioglu P, Kadow IG, Zhan X, Okamura K, Suh GS, Gunning D, Lai EC, Zipursky SL, 2008. Hybrid neurons in a microRNA mutant are putative evolutionary intermediates in insect CO2 sensory systems. *Science*, 319(5867): 1256 – 1260.

Chen LH, Chiou GY, Chen YW, Li HY, Chiou SH, 2010. MicroRNA and aging: a novel modulator in regulating the aging network. *Ageing Res. Rev.*, 9(Suppl. 1): S59 – S66.

Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH, 2010. p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ.*, 17(2): 236 – 245.

Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L, 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science*, 292(5514): 104 – 106.

Dann SG, Thomas G, 2006. The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.*, 580(12): 2821 – 2829.

de Lencastre A, Pincus Z, Zhou K, Kato M, Lee SS, Slack FJ, 2010. MicroRNAs both promote and antagonize longevity in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, 20(24): 2159 – 2168.

Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL, 2009. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(12): 837 – 841.

Esslinger SM, Schwalb B, Helfer S, Michalik KM, Witte H, Maier KC, Martin D, Michalke B, Tresch A, Cramer P, Förstemann K, 2013. *Drosophila* miR-277 controls branched-chain amino acid catabolism and affects lifespan. *RNA Biology*, 10(6): 1042 – 1056.

Fontana L, Kennedy BK, Longo VD, Seals D, Melov S, 2014. Medical research: treat ageing. *Nature*, 511(7510): 405 – 407.

Garg D, Cohen SM, 2014. miRNAs and aging: a genetic perspective. *Ageing Res. Rev.*, 17: 3 – 8.

Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B, Celniker SE, 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 471(7339): 473 – 479.

Grewal SS, 2009. Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41(5): 1006 – 1010.

Grönke S, Clarke DF, Broughton S, Andrews TD, Partridge L, 2010. Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS Genet.*, 6(2): e1000857.

Grün D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N, 2005. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput. Biol.*, 1(1): e13.

Guertin DA, Sabatini DM, 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci. Signal.*, 2(67): pe24.

He Y, Jasper H, 2014. Studying aging in *Drosophila*. *Methods*, 68(1): 129 – 133.

Hilgers V, Bushati N, Cohen SM, 2010. *Drosophila* microRNAs 263a/b confer robustness during development by protecting nascent sense organs from apoptosis. *PLoS Biol.*, 8(6): e1000396.

Hwangbo DS, Gershman B, Tu MP, Palmer M, Tatar M, 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991): 562 – 566.

Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, Chung J, Kim VN, 2009. Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell*, 139(6): 1096 – 1108.

Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M, 2013. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, 493(7432): 338 – 345.

Katewa SD, Kapahi P, 2011. Role of TOR signaling in aging and related biological processes in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.*, 46(5): 382 – 390.

Kato M, Slack FJ, 2013. Ageing and the small, non-coding RNA world. *Ageing Res. Rev.*, 12(1): 429 – 435.

Kozomara A, Griffiths-Jones S, 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue): D152 – D157.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853 – 858.

Legeai F, Rizk G, Walsh T, Edwards O, Gordon K, Lavenier D, Leterme N, Mereau A, Nicolas J, Tagu D, Jaubert-Possamai S, 2010. Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *BMC Genomics*, 11(1): 281.

Li M, Jones-Rhoades MW, Lau NC, Bartel DP, Rougvie AE, 2005. Regulatory mutations of mir-48, a *C. elegans* let-7 family MicroRNA, cause developmental timing defects. *Dev. Cell*, 9(3): 415 – 422.

Li Y, Wang F, Lee JA, Gao FB, 2006. MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 20(20): 2793 – 2805.

Liu N, Landreh M, Cao K, Abe M, Hendriks GJ, Kennerdell JR, Zhu Y, Wang LS, Bonini NM, 2012. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, 482(7386): 519 – 523.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G, 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6): 1194 – 1217.

Mirth C, Truman JW, Riddiford LM, 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.*, 15(20): 1796 – 1807.

Moretti F, Thermann R, Hentze MW, 2010. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5′ untranslated region or the open reading frame. *RNA*, 16(12): 2493 – 2502.

Niccoli T, Partridge L, 2012. Ageing as a risk factor for disease. *Curr.*

Biol., 22(17): R741 – R752.

Nielsen MD, Luo X, Biteau B, Syverson K, Jasper H, 2008. 14-3-3 Epsilon antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*. *Aging Cell*, 7(5): 688 – 699.

Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MD, 2011. Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Experimental Gerontology*, 46(5): 376 – 381.

Robins H, Li Y, Padgett RW, 2005. Incorporating structure to predict microRNA targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(11): 4006 – 4009.

Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC, 2007. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res.*, 17(12): 1850 – 1864.

Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V, 2003. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and Broad-Complex gene activity. *Dev. Biol.*, 259(1): 9 – 18.

Slack C, Werz C, Wieser D, Alic N, Foley A, Stocker H, Withers DJ, Thornton JM, Hafen E, Partridge L, 2010. Regulation of lifespan, metabolism, and stress responses by the *Drosophila* SH2B protein, Lnk. *PLoS Genet.*, 6(3): e1000881.

Sokol NS, 2008. An overview of the identification, detection, and functional analysis of *Drosophila* microRNAs. *Methods Mol. Biol.*, 420: 319 – 334.

Stenesen D, Suh JM, Seo J, Yu K, Lee KS, Kim JS, Min KJ, Graff JM, 2013. Dietary adenosine nucleotide biosynthesis and AMPK regulate adult life span and mediate the longevity benefit of caloric restriction in flies. *Cell Metab.*, 17(1): 101 – 112.

Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS, 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292(5514): 107 – 110.

Toledano H, D'Alterio C, Czech B, Levine E, Jones DL, 2012. The let-7-Imp axis regulates ageing of the *Drosophila* testis stem-cell niche. *Nature*, 485(7400): 605 – 610.

Vallejo DM, Caparros E, Dominguez M, 2011. Targeting Notch signalling by the conserved miR-8/200 microRNA family in development and cancer cells. *EMBO J.*, 30(4): 756 – 769.

Varghese J, Cohen SM, 2007. MicroRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 21(18): 2277 – 2282.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN, 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3): 471 – 484.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA, 2003. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.*, 13(9): 790 – 795.

Yamakuchi M, Lowenstein CJ, 2009. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*, 8(5): 712 – 715.

Yisraeli JK, 2005. VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biol. Cell*, 97(1): 87 – 96.

（责任编辑：赵利辉）